

**DELPHION****RESEARCH****PRODUCTS****INSIDE DELPHION**[Log Out](#) [Work Files](#) [Saved Searches](#)[My Account](#)Search: [Quick/Number](#) [Boolean](#) [Advanced](#) [Derwent](#)**The Delphion Integrated View**Get Now: ☒ [PDF](#) | [File History](#) | [Other choices](#)Tools: [Add to Work File](#): [Create new Work File](#)View: [INPADOC](#) | Jump to: [Top](#)Go to: [Derwent](#)[Email this to a](#)Title: **JP03105251A2: PREPARING APPARATUS OF SAMPLE**Derwent Title: Device used to prepare samples for nucleic acids - has vessels with mol.wt. sepn. membrane, centrifugal separator and vessel transfer machine [\[Derwent Record\]](#)

Country: JP Japan

Kind: A

Inventor: FUJITA MASAHIKO;  
KANBARA HIDEKI;  
MURAKAWA KATSUJI;  
NAGAI KEIICHI;  
SHIMADA TAMOTSU;Assignee: HITACHI LTD  
[News, Profiles, Stocks and More about this company](#)

Published / Filed: 1991-05-02 / 1989-09-20

Application Number: JP1989000242008

IPC Code: Advanced: [G01N 33/48](#); [G01N 33/50](#);  
Core: [more...](#)  
IPC-7: [G01N 33/48](#); [G01N 33/50](#);

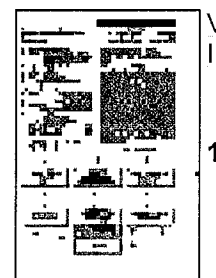
Priority Number: 1989-09-20 JP1989000242008

Abstract: PURPOSE: To reduce a burden of an operator in relation to an operation for preparation of a sample by providing at least a vessel provided with a molecular-weight separating film, a centrifuge bearing the vessel and applying a centrifugal acceleration to a liquid and a vessel conveyor conveying the vessel.

CONSTITUTION: A vessel 18 with a molecular-weight separating film is constructed of the molecular-weight separating film 18a, a base 18b of this separating film 18a, an O ring 18c and vessel walls 18d and 18e, and a condensed liquid 18f is collected onto the side of 18d and a filtered liquid 18g onto the side of 18e by applying a centrifugal acceleration in a centrifuge 11. Between the base 18b and the vessel wall 18e a gap 18i is provided so that air can enter and leave freely and that a filtering operation can be conducted smoothly. By this molecular-weight separating film, a substance of a smaller molecular weight than a prescribed value in a solution is filtered and a substance of a larger molecular weight than a prescribed weight is left on the upper side of the film. In order to increase the speed of filtration, in addition, the centrifugal acceleration is applied to the vessel by the centrifuge 11. On the occasion, the vessel 18 is set on the centrifuge 11 and a processing is executed by using a vessel conveyor 14.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&amp;Japio

Family: None



Other Abstract Info: [DERABS C91-174340](#) [DERC91-174340](#)



[Nominate this for the Gallery...](#)



Copyright © 1997-2007 The Thomson Corp

[Subscriptions](#) | [Web Seminars](#) | [Privacy](#) | [Terms & Conditions](#) | [Site Map](#) | [Contact Us](#) | [Help](#)

## ⑫ 公開特許公報(A)

平3-105251

⑤Int. Cl.<sup>5</sup>G 01 N 33/48  
33/50

識別記号

C  
P

庁内整理番号

7055-2G  
7055-2G

⑬公開 平成3年(1991)5月2日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全6頁)

⑭発明の名称 試料調製装置

⑰特 願 平1-242008

⑱出 願 平1(1989)9月20日

⑲発明者 藤田 雅彦 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑲発明者 神原 秀記 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所基礎研究所内

⑲発明者 村川 克二 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲発明者 永井 啓一 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内

⑲出願人 株式会社日立製作所 東京都千代田区神田駿河台4丁目6番地

⑲代理人 弁理士 小川 勝男 外1名

最終頁に続く

## 明 細 書

〔従来の技術〕

## 1. 発明の名称

試料調製装置

## 2. 特許請求の範囲

1. 液体を移送する分注機、試料・試薬を保存する保冷室、試料を加温するインキュベータ、機構の動作を制御するコントローラ、試料や試薬を混合するスペースを有する試料調製装置において、分子量分離膜を備えた容器、前記容器を搭載して液体に遠心加速度をかける遠心分離機、前記容器を搬送する容器搬送機を具備することを特徴とする試料調製装置。
2. 請求項第1項記載の遠心分離機に代えて、前記容器の分子量分離膜の上面を加圧する加圧機を設けたことを特徴とする試料調製装置。

## 3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は核酸等の生体物質の試料を調製する装置に係り、特に生体試料を分子量の差を用いて自動的に分離する試料調製装置に関する。

分子量分離が必要なプロセスには、ニユークリック、アシツズ、リサーチ 15, 529(1987年)(Nucleic Acids Research 15, p 529(1987))に記載の次のプロセスがある。二種類のプライマーを用いて、DNAポリメラーゼ、dNTPをDNA試料に注入してゲノム中の一部の配列部位を増幅する。この増幅断片の有無、断片長を調べることによってある程度の情報を得られるが、個人識別や感染症等の確定診断結果を得るためには増幅断片の配列を解析する。まず検出用の標識プライマーをアニールし、DNAポリメラーゼ、相補鎖の伸長/停止剤であるdNTP/ddNTP混合液を添加してシーケンシング反応を行わせる。シーケンシング反応を信頼良く行うには、増幅プライマーの鋳型DNAへのアニールを防いだりdNTP/ddNTPの比率を制御するために、増幅反応に用いられたプライマー及びdNTPを除去する。これには分子量の差を利用して膜分離する方法が用いられてきた。

上記一連のプロセスの内、DNA試料に熱サイクルをかけて特定配列部位を増増するプロセスが特開昭62-240862号に、またシーケンシング反応については特開平1-97863号に記載のように自動化された。

〔発明が解決しようとする課題〕

上記従来技術では、増幅DNA断片をプライマーやdNTPから分離する煩雑な操作が自動化されておらず、増幅からシーケンシングまでを一貫して自動化できず、サンプルを他の装置に移しかえたりするのに時間がかかった。また増幅DNA断片を分子量分離するプロセス自体、時間と労力がかかり、操作者の負担は重かった。このために全所要時間6時間の内、約40%が実作業時間に必要であった。

本発明の目的は、分子量分離プロセスとその前後のプロセスを機械化して自動化率を高め、DNA解析における試料調製作業負担を大幅に増減できる装置を提供することにある。

〔課題を解決するための手段〕

ブアを加え、容器搬送機を用いて前記容器を遠心分離機あるいは加圧機にセットして、遠心加速度をかけたりあるいは分子量分離膜上方から加圧して濾過する。次いで前記容器を再度分注機に搬送してバツブアを加えて遠心分離機あるいは加圧機に搬送して濾過する。この濾過動作を所定回数繰り返して増幅DNA断片を増幅反応に用いたプライマーとdNTPから分離した後、分子量分離膜上側に残った増幅DNA断片を含む溶液を用いてシーケンシング反応を実施する。

これによつて分子量分離プロセスとその前後のプロセスを自動化できるので、プロセスの自動化率を高められる。

〔実施例〕

以下、本発明の実施例の全体装置構成を第3図により説明する。図において1は試料・試薬を貯蔵・保温・搬送するのに用いられる容器を示し、はめあい可能なふたと一体成形でつくられている。本実施例では容器1が試料・試薬を混合するスペースを兼ねている。18は容器1と同じ外径を有

上記目的を達成するために、本発明の装置においては、少なくとも分子量分離膜を備えた容器、前記容器を搭載して液体に遠心加速度をかける遠心分離機、前記容器を搬送する容器搬送機を設ける。

また上記目的を達成するために、前記遠心分離機に代えて、前記容器の分子量分離膜の傷面を加圧する加圧機を設ける。

〔作用〕

容器に備えられた分子量分離膜では、溶液中の所定値より小さい分子量の物質が濾過され、膜の上には所定値より大きい分子量の物質が残る。前記容器においては膜下面の空気が容器外側と流通して濾過動作がスムーズに行えるよう構成されている。本発明においてはさらに濾過速度を高くするために、前記容器に遠心加速度をかける方法あるいは空気圧をかける方法を用いた。

増幅したDNA断片を分子量分離する場合は、インキュベータ増幅反応が終わった溶液分注機を用いて分子量分離膜付きの容器に移し、かつバツ

する分子量分離膜付容器である。この構造については第2図を用いて後に説明する。

7は容器1または容器18に液体を分注する分注機、2は分注機7に容器1または容器18を搬送するターンテーブルで、図示しないモータにより駆動される。3はターンテーブル2によつて搬送された容器1のふたを開くふた開機構、4はターンテーブル2によつて搬送された容器1のふたを閉じるふた閉機構、5は分注機7に供給される使い捨てチップ、6は使い捨てチップ5を供給するチップ供給機、15はターンテーブル2とチップ供給機6との間に設けられたチップ廃棄孔である。

8は密閉容器で、その内溶液は図示されない空気配管、電磁弁、空気タンク、圧力調整弁、真空ポンプを用いて、ターンテーブル2上の容器1または18に圧送される。

9は保冷室で冷蔵保存室9a、冷凍保存室9bよりなる。10は容器1内の液体を加温するインキュベータで、ふた開閉部材10a、外箱10b、

容器を搭載して加温する金属ブロック10c、図示されないヒータ、及び冷凍サイクルを利用する金属ブロック10cの冷却部材よりなる。

11は遠心分離機で、第1図と第3図を用いて後述する。

12は混合機で、エアシリンダ12aにより駆動される容器押さえ機構12b、容器方向修正機構12c、ポルテックスミキサ12dよりなる。13はふたが開かれた容器1を固定し、容器1を反転して容器1内の液体を廃棄する容器反転機で、容器固定台13c、モータ13a、歯車13bよりなる。

14は容器1または容器18を分注機7、遠心分離機11、混合機12、保冷室9、インキュベータ10、容器反転機13、容器廃棄孔16間に搬送する容器搬送機で、X軸駆動機構用のモータ14a、カップリング14b、ボールネジ14c、ガイド部材14d、図示しないY軸駆動機構用のモータ、カップリング、ボールネジ、ガイド部材14d、上下移動機構14e、容器保持機構14f

分子量分離膜付容器18は第2図に示したように、分子量分離膜18a、分子量分離膜18aの基台18b、Oリング18c、容器壁18d、18eよりなり、遠心分離機11において遠心加速度をかけることにより18dの側に濃縮液18f、18eの側に濾液18gがたまる。なお基台18bと容器18eの間にはすき間18iを設けて、空気が自由に出入りでき、濾過動作がスムーズに行えるように構成されている。

第4図を用いて分子量分離手段として遠心分離機11に代えて、分子量分離膜上側を加圧する加圧機を用いる第二実施例を説明する。

加圧機19は、加圧配管19aを内包する配管接着部19b、図示しないエアシリンダあるいはモータを用いて配管接着部19bを上下移動する上下移動機構19c、変形可能な配管19d、電磁弁19e、配管19f、高圧源19g、空気抜き穴19hを有する容器18の固定台19iよりなる。分子量分離動作を行うときは、まずDNA試料とバッファが注入された容器18を容器搬送

よりなる。

また分注機7、遠心分離機11、混合機12、保冷室9、インキュベータ10、容器反転機13、容器搬送機14を制御するコントローラ（図示せず）が機械室17内に設けられている。

遠心分離機11の構成を第1図、第2図に示す。第1図に示したように、少なくとも容器18が挿入される容器挿入孔11a、容器挿入孔11aをもつアングルロータ11b、図示されない高速回転モータに直結した軸11cに、カム機構11d、カム機構11dとを回転するためのエアシリンダ11e、カム機構11dと連動するレバー11f、レバー11fに取り付けられたローラ11g、ローラ11gをカム11d側に押しつける図示しない弾性部材、ローラ11gを回転して位置決め動作を行うパルスモータ11h、外枠11i、容器18を容器搬送機14を用いて出し入れするとき容器挿入孔11aの中心軸を容器搬送機14の上下移動方向に一致させるための角度調節機（図示せず）よりなる。

機14を用いて固定台19iにセットし、次いで上下移動機構19cを用いて配管19aを有する接着部19bを容器18に押し付け、電磁弁19eを切換えて所定時間加圧する。加圧し終わった後は上下移動機構19cを用いて配管接着部19bを容器18から離し、容袋搬送機構14を用いて容器18を固定台19iから運び出す。第二実施例の全体構成は、遠心分離機11が加圧機19に代わった点以外は同じである。

以上の実施例におけるDNA増幅、分子量分離、シーケンシング反応の自動プロセスを次に示す。

ヒトのDNAには、マニアティス (Maniatis) の方法〔モレキュラ クローニング (Molecular Cloning) 280-281 (1982)〕に従って抽出したものを用いた。

1  $\mu$ g の上記ゲノムDNAを10mMトリス (Tris) HCl (pH 7.5), 50mM KCl, 2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 100  $\mu$ g/mlゼラチン, 0.5  $\mu$ M増幅用プライマー, 1.5mM dATP, 1.5mM dCTP, 1.5mM dGTP, 1.5

11  
図

m M d T T P を含有する初期体積 100  $\mu$  l の水溶性反応液中に希釈した。これに 40  $\mu$  l の鉱油を重ねた後、98℃で10分間加熱してゲノム DNA を変性し、次いで 50℃に冷却した。ここにサーマス・アクアティカスからの 2  $\mu$  l のポリメラーゼを添加し、この DNA サンプルにつき次の熱サイクルをインキュベータを用いて繰返して 25 サイクルの増幅を行った。

- 1) 3 分間にわたる 50℃から 94℃への加熱
- 2) プライマー及び DNA をアニールさせるための 94℃から 50℃までの 3 分間にわたる冷却
- 3) プライマー延長生成物を生ぜしめるための 70℃での 2 分間の保温

最終サイクル後、サンプルを 72℃でさらに 10 分間インキュベートして最終延長反応を完結させた。増幅反応に用いたプライマーの配列は 5' - ATGCTAAGTTAGCTTTACAG - 3' 及び 5' - ACAGTTTCATGCCCATCGTC - 3' で、ヒトミトコンドリア DNA の一部を増幅して 121 bp の増幅断片が生じるようにした。

で 3 分間加熱し 42℃で 20 分間保温し室温で 5 分間冷却した。これにサーマス・アクアティカスからの 2  $\mu$  l のポリメラーゼを添加して 4 等分し、相補鎖合成の伸長/停止剤である d N T P / dd N T P の混合液を 1.2  $\mu$  l 添加して 70℃で 3 分間加熱した後、2  $\mu$  l のフオルムアミドを加え、さらに 75℃で 5 分間加熱して相補鎖合成反応を停止させ自動プロセスを終了させた。

この反応液を 6% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動分離し、A ーレーザを用いて蛍光を励起して DNA 断片群を検出したところ、該当する塩基配列に相当する DNA 断片群を検出できた。このことから増幅に用いられたプライマー、dNTP が充分分離され、シーケンシング反応を信頼良く行えたことが確かめられた。

以上述べたように、本実施例によれば DNA 増幅分子量分離、シーケンシング反応を自動で信頼良く行える。また DNA 増幅からシーケンシング反応までを行うには、6~7 時間かかるが、本発明によりプロセスを 1 台の装置で連続して処理で

このようにして得られた DNA 断片を、分画分子量 30000 の分子量分離膜付容器に移して、遠心加速度をかけるかあるいは加圧して分子量分離した。遠心分離機を使う場合は遠心加速度 3000 G を 30 分かけ、加圧機を使う場合は高压側から圧力 2 kg/cm<sup>2</sup> を 10 分かけて分離した。パツプアを加えて分離動作を 1 回繰返した。分子量分離膜上部に残った濃縮液と膜を透過した濾過を 8% ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動分離し、エチジウムブロマイドで染色して検出した。

その結果、濃縮液には 121 bp のバンド 1 本のみが認められて、増幅プライマーは認められなかった。さらに濾液に関しては増幅プライマーのみが認められ、この結果本自動プロセスにより増幅 DNA 断片を精度良く分子量分離できることを確かめた。

次いで増幅 DNA 断片 3 pmole を、蛍光標識プライマー 3 pmole (5' - ATTCGCCTAAAAATCITTTGA - 3')、10 mM Tris-HCl (pH 7.5)、8 mM MgCl<sub>2</sub> と混合し、前記混合液を 90℃

きるので、操作者の負担は大幅に軽減される。

#### 〔発明の効果〕

以上述べたように本発明によれば、分子量分離とその前後のプロセスを併せて機械化できるので、自動化率が高まり、DNA 解析における操作者の試料調製作業負担を大幅に軽減できる。

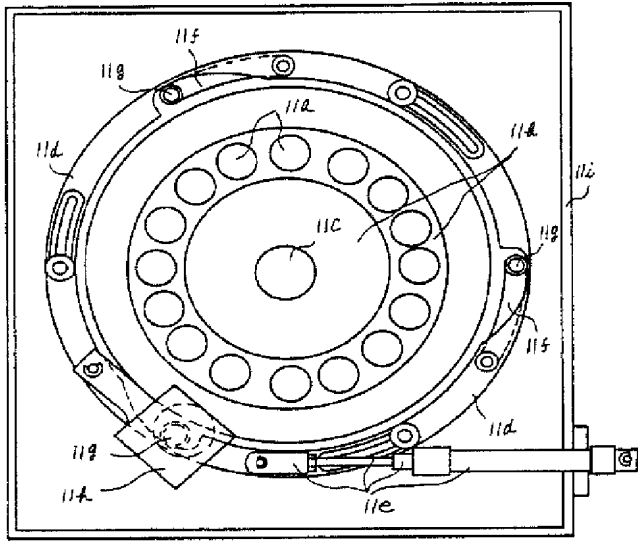
#### 4. 図面の簡単な説明

第 1 図は遠心分離機の平面図、第 2 図は分子量分離動作を示す遠心分離機の断面図、第 3 図は本発明の一実施例による試料調製装置の全体構成の斜視図、第 4 図は加圧分離機の断面図である。  
7…分注機、9…保冷室、10…インキュベータ、11…遠心分離機、14…容器搬送機、18…分子量分離膜付容器、19…加圧機。

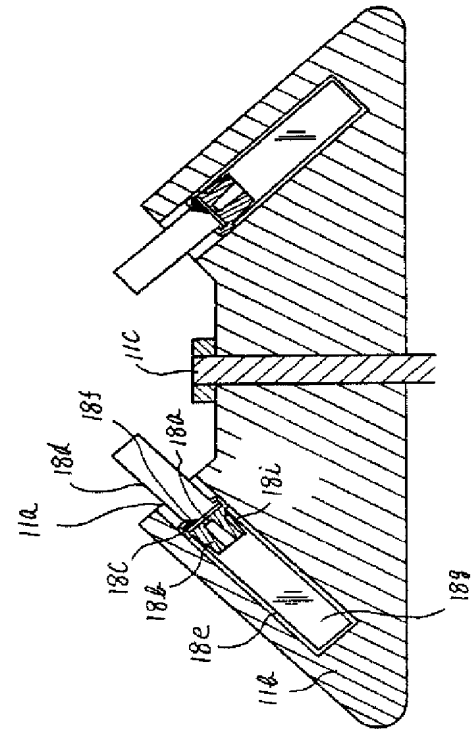
代理人 弁理士 小川勝男



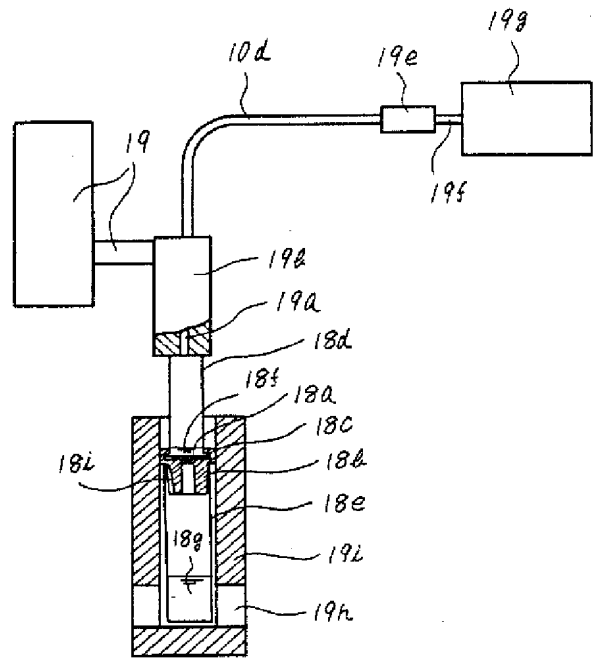
第 1 図



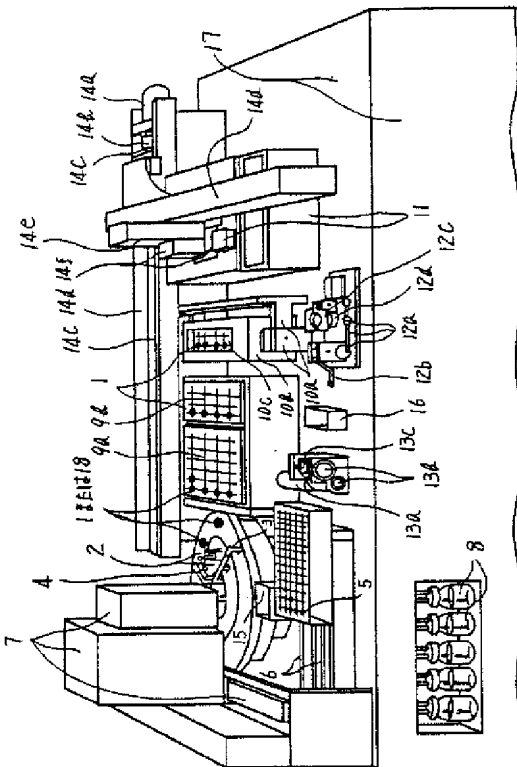
第 2 図



第 4 図



第 3 図



第1頁の続き

⑦発明者 嶋 田 保 東京都国分寺市東恋ヶ窪1丁目280番地 株式会社日立製作所中央研究所内